

ビタミン K₂ 変換酵素 UBIAD1 の生理的な役割

廣田 佳久

鈴鹿医療科学大学 薬学部 薬学科

総 説

ビタミン K₂ 変換酵素 UBIAD1 の生理的な役割

廣田 佳久

鈴鹿医療科学大学 薬学部 薬学科

キーワード： ビタミン K, UBIAD1, phyloquinone, menaquinone, menadione, 遺伝子欠損マウス

要 旨

ビタミン K は 2-methyl-1,4-naphthoquinone を基本骨格として、3 位の側鎖構造の違いにより 3 つの同族体に分類される。側鎖に phytyl 基を有する植物由来のビタミン K₁ (phyloquinone : PK) や isoprene 側鎖を持ち腸内細菌に由来するビタミン K₂ (menaquinone-n : MK-n), 合成品として側鎖を持たないビタミン K₃ (menadione : MD) が存在する。ヒトが食事から摂取するビタミン K は主に PK であるが, 組織中に存在するビタミン K の大部分は menaquinone-4 (MK-4) であるため, 生体内で PK から MK-4 へ変換され蓄積することが予想されたが, この変換機構は 50 年以上明らかにされなかった。最近ビタミン K の代謝機構が解明され, 摂取した PK は小腸で側鎖が切断され側鎖を持たない MD となり, リンパ管を介して各組織に移行した MD が UbiA prenyltransferase domain containing protein 1 (UBIAD1) によって MK-4 へ変換されることが分かった。この UBIAD1 の発見に伴い, 近年では UBIAD1 を中心とした様々な研究が報告され, UBIAD1 と疾患との関連が明らかにされている。そこで本稿では, 最近の研究成果をまじえながら生体内におけるビタミン K の変換機構および変換酵素 UBIAD1 の役割について概説する。

1. はじめに

ビタミン K は、1936 年にデンマーク人の Dam によって発見された¹⁾。Dam はコレステロール研究の際に、ニワトリの雛を無脂肪食で飼育していたところ、皮下出血や貧血が認められ採血した血液が凝固しにくいことを発見した。さらに詳細な研究によって、抗出血性物質が脂溶性であり、肝臓や種々の植物体抽出物中に存在することを見出した。Dam は、この未知の栄養成分を血液凝固（ドイツ語の Koagulation）にちなんでビタミン K と命名した。また、Thayer らはビタミン K₁ およびビタミン K₂ をそれぞれアルファルファと腐敗した魚肉から単離し構造を決定した²⁾。ビタミン K は 2-methyl-1,4-naphthoquinone を基本骨格として、3 位の側鎖構造の違いにより同族体に分類される³⁾。天然には、植物由来のビタミン K₁（phyloquinone : PK）と腸内細菌や発酵食品に由来するビタミン K₂（menaquinone 類 : MK-n）が存在する²⁾。PK は 3 位に phytyl 側鎖を有するが、MK-n は、側鎖の isoprenyl 基の数（n）に応じて n = 1 ~

14 の同族体が存在する⁴⁾。MK-n のうち、n = 4 である MK-4 は PK と同じ側鎖長を有し、ビタミン K 同族体で最も多岐に渡る生理活性を有することが報告されている⁵⁾。現在わが国では、PK は抗出血薬として、MK-4 は骨粗鬆症治療薬として臨床応用されている。この他、合成品として 2-methyl-1,4-naphthoquinone 骨格のみの構造体であるビタミン K₃（menadione : MD）が存在する（図 1）。

2. ビタミン K の生理作用

食事から摂取されるビタミン K は、脂質の吸収、輸送系を介して標的組織へ移行すると考えられている。標的組織の細胞に移行したビタミン K は、細胞内の小胞体でビタミン K サイクルと呼ばれる酸化還元サイクルにより代謝されると同時に、 γ -glutamyl carboxylase（GGCX）の補因子として働き、ビタミン K 依存性タンパク質の活性化を担う⁶⁾。ビタミン K 依存性タンパク質としては、血液凝固第 II, VII, IX, X 因子やプロテイン C, S および骨に分布する

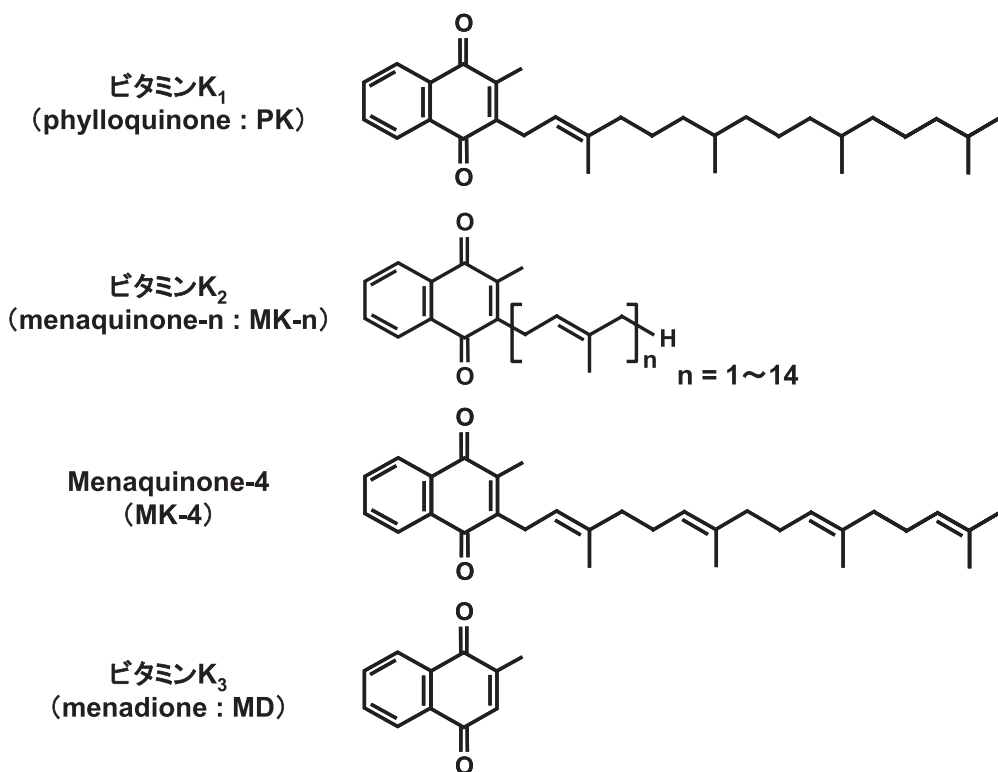


図 1 ビタミン K 同族体の化学構造

osteocalcin (OC) や matrix Gla protein (MGP) などがあり、これらのタンパク質は GGCX により、glutamic acid (Glu) 残基が γ -glutamyl carboxyl 化 (Gla 化) され、 γ -carboxyglutamic acid (Gla) を有する活性型となり、血液凝固や骨形成に働く。

ビタミン K サイクルにおける vitamin K-dependent protein (VKDP) の Gla 化作用に加え、Tabb らは MK-4 が核内受容体 steroid and xenobiotic receptor (SXR) のリガンドとして遺伝子の発現を制御することを明らかにした⁷⁾。SXR は、リファンピシンやクロトリマゾールなどをはじめ、様々な薬剤をリガンドとし⁸⁻¹⁰⁾、retinoid X receptor (RXR) とヘテロ二量体を形成して、標的遺伝子上の SXR responsive element (SXRE) に結合することにより、遺伝子の転写を調節している^{11, 12)}。ヒト骨芽細胞を用いた研究において、MK-4 は SXR を介して、薬物代謝酵素であるシトクローム P450 (CYP) 3A4、骨基質タンパク質である osteocalcin や

MGP の他、コラーゲンの蓄積に関与する matrillin 2 (MATN2) や tsukushi (TSK) の発現を誘導することが報告されている^{7, 13)}。この SXR を介した作用は、ビタミン K のうち MK-4 に特異的に認められるものであり、PK は SXR を介した作用を示さない。最近ではさらに、Ichikawa らによってビタミン K サイクルや SXR を介した作用以外に、MK-4 が protein kinase A (PKA) のリン酸化作用を促進することが報告されている¹⁴⁾。MK-4 は、ヒト骨芽細胞の PKA を活性化し、細胞分化増殖因子である growth differentiation factor 15 (GDF15) およびカルシウム調節因子である stanniocalcin 2 (STC2) を介して骨形成を促進する^{7, 13)}。このように MK-4 は、GGCX 活性、SXR を介した転写調節、PKA の活性化など様々な作用によって骨芽細胞の分化や骨の石灰化を促進することが明らかとなっている (図 2)。また Suhara らは、MK-4 の方が PK に比べ標的細胞への取り込み速度やビタミン K サ

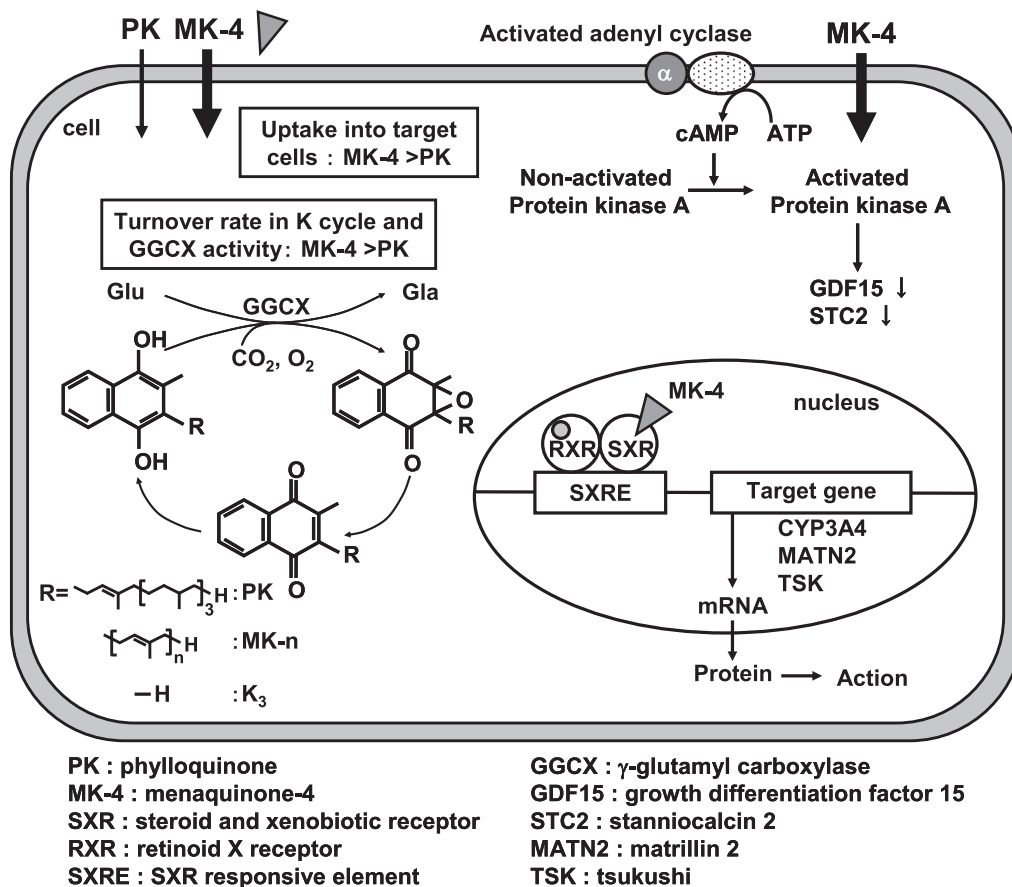


図 2 MK-4 の細胞内における利用性

イクルにおける代謝変換が速いことを報告し¹⁵⁾, Buitenhuis らは GGCX に対する補酵素活性も MK-4 がもっとも高いと報告している¹⁶⁾。さらに、ビタミン K 同族体の中で、MK-4 は肝がん細胞や白血病細胞に対して強いアポトーシス誘導作用を示すこと¹⁷⁻¹⁹⁾、神経細胞の生存性維持に働くこと²⁰⁾、抗酸化活性を持ち電子伝達系にも関与することなど²¹⁾、PK や他のビタミン K 同族体とは異なり MK-4 特有の多岐にわたる生理作用が報告されている。

3. ビタミン K 同族体から MK-4 への変換反応

ビタミン K 同族体の中でもっとも強い生理活性を示す MK-4 は、ヒトやマウス、ラットの組織中に高濃度に存在する²²⁻²⁴⁾。ヒトは、日常の食事から緑色野菜などに含まれる植物由来の PK や、発酵食品中に多く含まれる MK-6～8 (納豆は MK-7 が最も多く含まれる) を摂取しているが、動物性食品に含まれる MK-4 の摂取量は極めて少ない。また、ラットやマウスの飼育飼料中に含まれるビタミン K は MD であり、その他には PK がわずかに含まれるのみである。このようにヒトやマウス、ラットは MK-4 をほとんど摂取していないにもかかわらず、組織中に MK-4 が最も高濃度に存在することから、摂取したビタミン K が MK-4 に変換されている可能性が高いと考えられている。この MK-4 の変換については、Martius ら²⁵⁾ や Ronden, Davidson らによって^{26, 27)}、PK や MD が MK-4 に変換されることが示されてきた。また、腸内細菌に MK-n 合成能があることから腸内細菌の関与が示唆されたため、Kimura らは無菌マウスやラットを用いて研究を行ったが、腸内細菌が存在しない体内環境においても PK や MK-n, MD から MK-4 が変換生成する可能性が高いことを示した²⁸⁾。しかし、MK-4 が発見されて 50 年以上の間、摂取したビタミン K 同族体から MK-4 に変換するという科学的に十分な証明がされてこなかった。

このような背景から Okano らは、様々な重水素標識ビタミン K 化合物を合成し、これをマウスに経

口、経腸、静脈内および脳室内投与し、大脳中に重水素標識した MK-4 (MK-4-d₇) が検出されるかを検討した。その結果、重水素標識ビタミン K を経口および経腸投与した場合においてのみ、大脳中に MK-4-d₇ が高濃度に検出されることが明らかとなり、NMR により大脳中に生成した MK-4 が MK-4-d₇ であることを科学的に証明することに成功した (図3)²²⁾。また、側鎖に重水素標識した MK-4 (MK-4-d₉) を投与したマウス大脳には、投与した MK-4-d₉ は全く検出されず、MK-4-d₇ のみが認められた。この結果から、MK-4 変換機構では、側鎖の不飽和化反応は起こらず、geranylgeranyl 側鎖の付加反応が必要であることが分かった (図3)。さらに、ヒト骨芽細胞様細胞 (MG63 細胞) やマウス胎仔由来の神経細胞等を用いた検討により、MK-4 の変換反応が細胞レベルでも起こることを明らかにした^{22, 29)}。食事より摂取した PK が MK-4 に変換される反応機構としては、PK の phytyl 側鎖が naphthoquinone 環から外れて MD となり、その後メバロン酸代謝経路より産生される geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) が側鎖として結合し MK-4 が変換される経路が仮説として示されている²²⁾。これまでに、Thijssen らは、PK や MK-7 を摂取したヒトの尿中に、MD のグルクロン酸抱合体が排泄されることを示しており、この仮説を支持している³⁾。

Hirota らは、この仮説を立証するために腸からのビタミン K の吸収経路であるリンパ管や門脈などをカニューレションしたラットを作製し、重水素標識した PK (PK-d₇) や重水素標識した MK-7 (MK-7-d₇) の投与を行った。その結果、PK-d₇ や MK-7-d₇ はリンパ管を介して吸収され、一部は腸管内で側鎖切断されて MD-d₇ となり、生成した MD-d₇ もリンパ管から吸収されることが分かった。リンパ液中に存在した MD は精製を行った後、Orbitrap 質量分析計を用いた高分解能 MS 解析から 180.10 (m/z) の分子イオンシグナルを検出し、MD-d₇ の化学的な構造同定に成功した³⁰⁾。また、ビタミン K の側鎖切断反応は、PK を経口摂取したヒトの血中においても MD が多く検出され

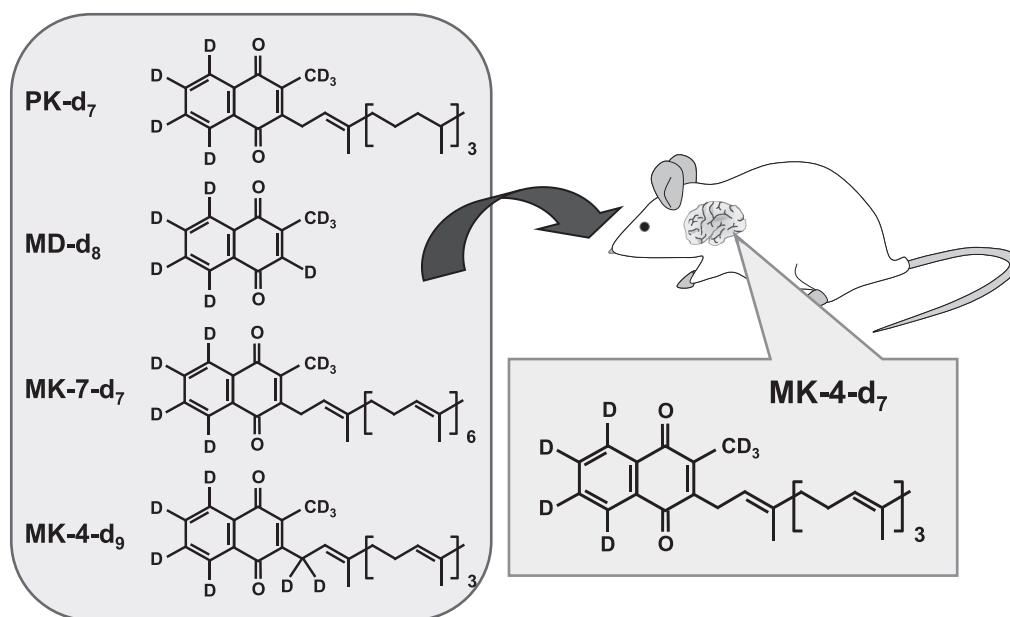


図3 マウス脳における重水素標識したビタミン K 同族体から MK-4-d₇ への変換

た事から、動物種を超えて普遍的に起こる反応であることが示された³⁰⁾。

腸内で生成した MD が MK-4 に変換されるには、geranylgeranyl 側鎖の結合が必要である。geranylgeranyl 構造を持つ化合物として生体内には GGPP が多く存在する。GGPP はメバロン酸経路により産生され、Ras や Rho といった低分子 G タンパク質の活性化を担うと共に、コレステロール合成における中間体として細胞機能に必須の役割を担う物質である^{31,32)}。そこで、MK-4 の変換反応に GGPP が関与するかを明らかにするため、培養細胞に新たに合成した重水素標識した GGPP (GGPP-d₅) を添加し、重水素標識された MK-4 の生成を評価した。その結果、GGPP-d₅ の添加量依存的に MK-4 の生成量が増加したことから、細胞内における MK-4 生成に GGPP が利用される可能性が強く示唆された。そこで、GGPP が産生されるメバロン酸経路阻害剤として HMG-CoA 還元酵素を阻害する statin 系薬剤と GGPP 合成の前段階である farnesyl pyrophosphate (FPP) の合成酵素を阻害する窒素含有 bisphosphonate を用いて検討を行った。その結果、statin 系薬剤または窒素含有 bisphosphonate 処理により MK-4 生成量は著しく低下し、いずれの系にも GGPP を添加供給することでメバロン酸経路阻

害剤を添加しないレベルまで回復した³³⁾。以上のことから、メバロン酸経路から産生される GGPP が MK-4 の変換には必須であることが分かった。

4. MK-4 変換酵素 UBIAD1 の同定

マウスやヒトの培養細胞などにおいて、ビタミン K 同族体から中間体 MD を経て geranylgeranyl 側鎖が結合する事によって MK-4 に変換されることが明らかとなったが、この変換反応を担う酵素は不明である (図 4)。そこで、MK-4 への変換を担う酵素を明らかにするため、大腸菌や枯草菌などの菌類が MK-n を生合成できることに着目した。哺乳動物をはじめとする高等生物において MD が MK-4 に変換されるには、geranylgeranyl 側鎖の置換あるいは付加が必要であるため、MK-4 変換酵素は geranylgeranyl 基などを付加できるプレニル化活性を有する酵素であると想定される。大腸菌においてプレニル化反応は menA という酵素が担っており、1,4-naphthoquinone 骨格に isoprenyl 側鎖を結合させる³⁴⁻³⁶⁾。そこで Nakagawa らは、大腸菌の menA の遺伝子配列をもとに、NCBI のゲノムデータベースよりヒトホモログを探索した。その結果、大腸菌の menA と高い相同性を有する遺伝

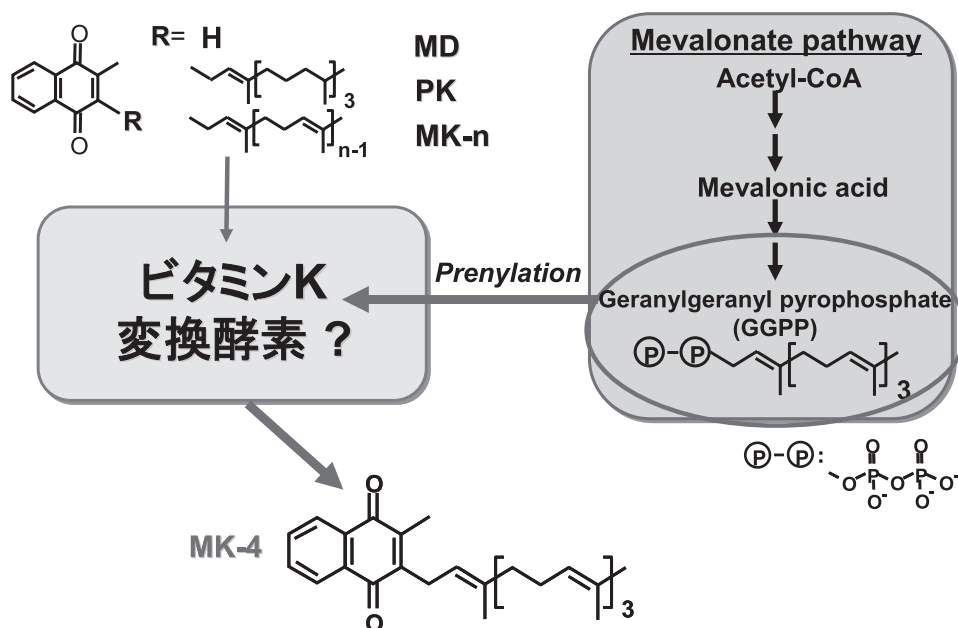


図4 予想されるビタミンK同族体からMK-4への変換機構

子として、UbiA prenyltransferase domain containing protein 1 (UBIAD1) と coenzyme Q2 homolog, prenyltransferase (yeast) (COQ2) を見出した²⁹⁾。UBIAD1 遺伝子は、ヒトの転移性膀胱がん細胞において発現が高い遺伝子 *transitional epithelial response gene* (TERE1) として 2003 年に見出された遺伝子である³⁷⁻³⁹⁾。また、Orr らによって常染色体優性遺伝病の一つで、角膜の脂質代謝異常により目が白濁する Schnyder corneal dystrophy (SCD) の原因遺伝子であることが明らかにされている⁴⁰⁻⁴²⁾。しかし、UBIAD1 タンパク質の機能は全く不明であった。一方、COQ2 は、coenzyme Q のプレニル化反応に重要な役割を持つ酵素として、出芽酵母菌から発見された遺伝子 *coq2* のヒトホモログである⁴³⁾。ヒト COQ2 は、電子伝達を担うミトコンドリアに局在し coenzyme Q10 (CoQ10) の合成酵素の1つである。COQ2 の変異により中枢神経障害による筋疾患、幼児期の腎機能障害による脳筋症、小脳萎縮による運動失調が発症することが報告されている^{44,45)}。そこで、候補として見出した UBIAD1 および COQ2 が MK-4 の変換に関与するかについて検討した。

UBIAD1 あるいは COQ2 遺伝子を siRNA によりノックダウンした細胞について、MK-4 変換活性を評

価した結果、COQ2 遺伝子をノックダウンした細胞では MK-4 の変換量に変化は認められなかった。しかし、UBIAD1 遺伝子をノックダウンした細胞では MK-4 の変換量が有意に低下した。UBIAD1 が MK-4 の変換反応に関与する可能性が高いと考え、UBIAD1 を過剰発現した細胞を用いた検討を行ったところ、UBIAD1 の発現量の増加に伴い UBIAD1 タンパク質の発現量および MK-4 の変換量は有意に増加した。このことから、UBIAD1 が MK-4 変換酵素である可能性が強く示唆された。そこでさらに、ヒトや哺乳動物の遺伝子を持たない昆虫細胞 (*Spodoptera frugiperda* 由来 Sf9 細胞) に、baculovirus 発現系によりヒト UBIAD1 タンパク質を大量に発現させる実験系を構築し、UBIAD1 の MK-4 変換活性を検討した。その結果、UBIAD1 を強発現する Sf9 細胞において著しく高い MD から MK-4 への変換活性が認められた。さらに、変換生成した MK-4 を ²H-NMR, LC-NMR, Q1 および Q3 MS による構造同定を行った結果、いずれの解析系を用いた場合でも標準品 MK-4 と同様のシグナルが得られた²⁹⁾。このことから、UBIAD1 は MD を基質として認識し、2-methyl-1,4-naphthoquinone 骨格の 3 位に GGPP を側鎖源として geranylgeranyl 側鎖を付加することにより MK-4 へ変

換することが、構造化学的にも証明された。以上の検討から、MK-4の変換生成を担う鍵酵素が UBIAD1 であることが明らかとなった²⁹⁾。

UBIAD1 は、1 番染色体上 (1p36.22) にコードされる最大 5 つの exon から成る 22 kbp に渡る遺伝子で、このうち離れた 2 つの exon がタンパク質をコードする領域である。UBIAD1 は、338 アミノ酸からなる 36.8 kDa のタンパク質で、アミノ酸構造より prenylation domain を有する 9 回膜貫通構造をとる膜タンパク質であると推察される (図 5)⁴⁶⁾。UBIAD1 は、これまでに小胞体やゴルジ体に共局在することが報告されている^{29, 30, 33, 47-49)}。Wang らの報告によると、UBIAD1 は N 末端にゴルジ体移行シグナル RPWS 配列を有し、小胞体でタンパク質に翻訳された後 coat protein complex II (COPII) を介してゴルジ体へ移行する⁴⁸⁾。このような報告を受けて、Hong らは小胞体移行シグナル LAY が UBIAD1 内に存在する事を明らかにしている⁴⁹⁾。

UBIAD1 遺伝子は全身の組織に発現しており、各組織における UBIAD1 の発現量および MK-4 変換活性、内因的に存在する MK-4 の量はほぼ一致する。そこで、UBIAD1 が生理的にどのような役割を担うかを明らかにする目的で、Nakagawa らは全身的に *Ubiad1* 遺伝子を欠損した (*Ubiad1*^{-/-}) マウスの作出を試み

た。*Ubiad1*^{-/-}マウスを作出する前に、*Ubiad1*^{-/-}マウスの親マウスである *Ubiad1* 遺伝子ヘテロ欠損 (*Ubiad1*^{+/-}) マウスについて評価した。その結果、*Ubiad1*^{+/-}マウスは正常に出生し、身長や体重といった外観や成長速度に違いは認められなかったが、組織中の MK-4 濃度は野生型マウスの約半分程度まで低下していた。そこで、*Ubiad1*^{+/-}マウスの雌雄を交配し、*Ubiad1*^{-/-}マウスの作出を試みた。ところが、交配を何度行っても *Ubiad1*^{-/-}マウスは 1 個体も得ることができず、*Ubiad1*^{-/-}マウスは胎生致死となる可能性が考えられた。そこで、致死ステージを明らかにするため胎生 3.5, 7.5, 10.5 日胚を解析した結果、胎生 7.5 日の *Ubiad1*^{-/-}マウスの胚は胚形成不全を示していたが、メンデルの法則に従い受精胚は存在していた。このことから、胎生 7.5 日～10.5 日の間に *Ubiad1*^{-/-}マウスが致死となることが分かった⁵⁰⁾。これまでに、致死原因は明らかでないが、マウスの発生過程において胎生 7.5 日～10.5 日の時期に致死となる要因としては、原腸陥入の異常や胚体外膜の機能欠損、卵黄嚢形成異常、尿膜の漿膜への融合異常、心臓・心血管の分化異常などが考えられる。

Ubiad1^{-/-}マウスの個体が得られなかったため、受精卵より *Ubiad1*^{-/-}マウス由来の ES 細胞を樹立し、MK-4 変換活性を評価した。その結果、*Ubiad1*^{-/-}マ

UbiA prenyltransferase domain containing protein 1 (UBIAD1)

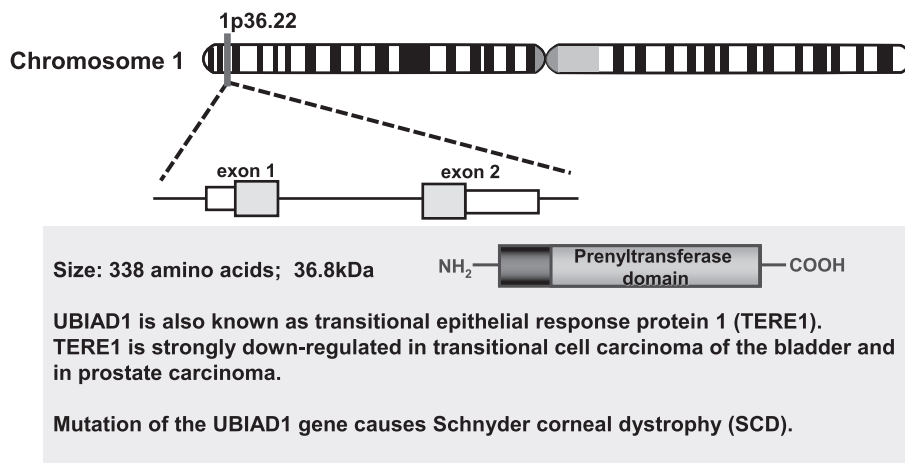


図 5 MK-4 変換酵素 UBIAD1

ウス由来の ES 細胞では、MK-4 変換活性が完全に消失していた。このような結果から、UBIAD1 は MK-4 変換に必須の酵素であり、UBIAD1 の欠損あるいはそれに伴う MK-4 の欠如は、マウスの発生異常を引き起こすことが明らかとなった。そこで、Ubiad1^{-/-}マウスの胎生致死が MK-4 の補給により改善されるのかを検討するため、交配と同時に母マウスに MK-4 を持続供給し、胎仔の遺伝子型を解析した。その結果、MK-4 を補給することにより、Ubiad1^{-/-}マウスが胎生 15.5 日齢まで野生型と同等の形態で生存できることが分かった。また一部は出生時には死亡するものの、出生直前まで生存維持される個体もあった⁵⁰⁾。以上のことから、個体発生の初期段階に MK-4 が欠乏することが、胎生期の発生異常を引き起こすと推察され、UBIAD1 はマウス個体発生に必須の因子であることが明らかとなった。

5. 様々な動物種における UBIAD1 の役割

マウス以外にも、これまでに様々な動物種における UBIAD1 の機能が報告されている。Vos らは、ショウジョウバエを用いた検討から ubiad1 の ortholog である heix を変異することにより、パーキンソン病の発症に関与する遺伝子 *parkin* と *pink1* との相互作用が変化し、電子伝達系に異常が起こることを報告している²¹⁾。さらに、*heix* が欠損したショウジョウバエに MK-4 を処理することによって、表現型が改善することを合わせて報告している²¹⁾。

ゼブラフィッシュでは Ubiad1 の変異によって、発生時に血管形成異常が認められると報告されている。Hegarty らは、ゼブラフィッシュの順遺伝学的解析 (forward genetic screening) を用いて、血管形成を調節するメカニズムを解析した。その結果、出生後まもなく著しい血管形成異常を示す *reddish* (*reh*) 変異体を同定し、この変異体は *ubiad1* に異常が認められることを報告した⁵¹⁾。さらに、*ubiad1* が変異したゼブラフィッシュに MK-4 または MK-4 に似た構造体である CoQ を投与すると、CoQ 投与では血管形成異常

は改善しなかったが、MK-4 投与により著しい改善が認められた。しかし、Mugoni らは Hegarty らと異なる Ubiad1 の変異したゼブラフィッシュ *barolo* (*bar*) を用いて、Ubiad1 がゴルジ体で CoQ を合成すること、CoQ によって Ubiad1 変異による心血管系の異常が改善する事を報告した⁴⁶⁾。

Ubiad1 が CoQ を合成するというゼブラフィッシュの報告を踏まえて、Nakagawa らは Ubiad1^{-/-}マウスを用いて CoQ の合成能を評価した⁵⁰⁾。MK-4 が全く検出されない Ubiad1^{-/-}マウス由来 ES 細胞を用いて CoQ 合成能を評価した結果、野生型と同程度の細胞内 CoQ 濃度が検出された。また、Hirota らは UBIAD1 の酵素反応系を用いて CoQ 合成能を検討した³³⁾。baculovirus によりヒト UBIAD1 またはヒト COQ2 を高発現した Sf9 細胞を樹立し、ゴルジ体を含むミクロソーム画分 (UBIAD1 ミクロソームまたは COQ2 ミクロソーム) をそれぞれ単離し CoQ 合成を検討した。その結果、UBIAD1 ミクロソームでは、MD から MK-4 への著しい変換が認められ、COQ2 ミクロソームでは CoQ の前駆物質である *p*-ヒドロキシ安息香酸 (PHB) とデカプレニル側鎖により CoQ が合成された。この時に、天然に存在する PHB と分離分析を行うため ¹³C 標識した PHB を用い、¹³C 標識された CoQ を検出した (図 6)。UBIAD1 ミクロソームを用いて ¹³C 標識した PHB およびデカプレニル側鎖を反応させたが、¹³C 標識された CoQ は検出されなかった。このような結果から、哺乳類では UBIAD1 による明確な CoQ 合成は認められなかった。

Nakagawa らはさらに、Ubiad1^{-/-}マウスに対する CoQ のレスキュー効果を評価した結果、MK-4 のレスキュー効果と同じく CoQ10 によっても、生存期間延長効果が認められた⁵⁰⁾。Ubiad1^{-/-}マウスにおいて、MK-4 のみならず CoQ10 にも同様の効果が認められた理由は明らかではないが、MK-4 と CoQ10 には抗酸化活性や電子伝達系へ関与など類似の機能があることから、MK-4 が担うべき機能を CoQ10 が補完した可能性があると考えられる。

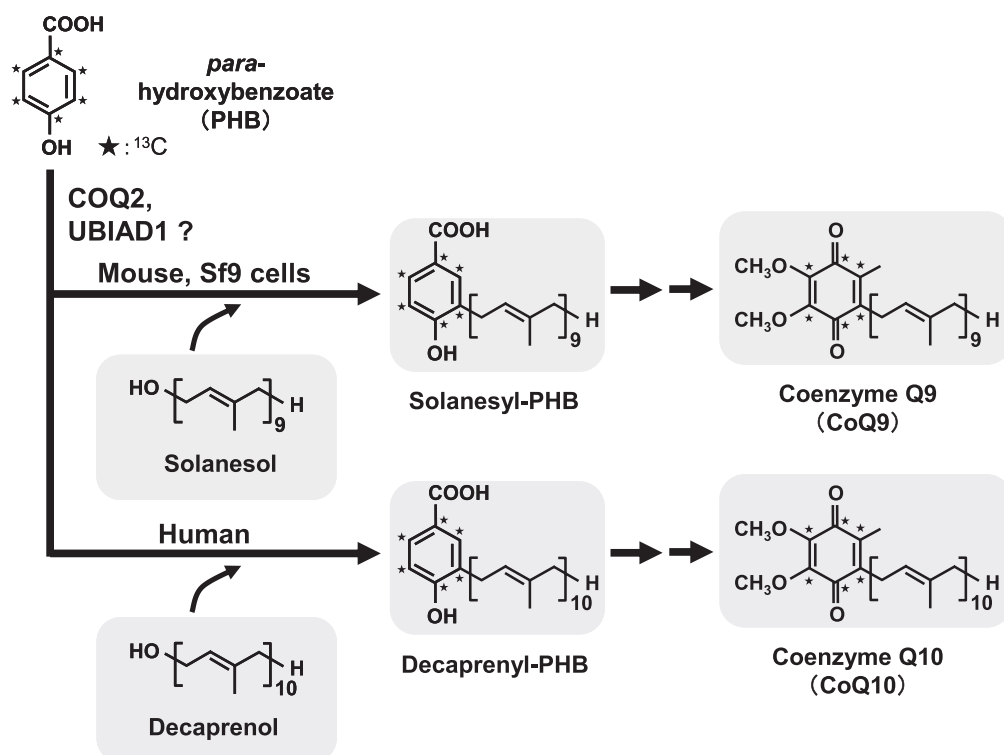


図6 UBIAD1 および COQ2 による PHB からユビキノン (CoQ-n) への合成機構

6. 最近の UBIAD1 研究

UBIAD1 の生理機能に関する報告は多数存在するが、UBIAD1 の遺伝子、タンパク質レベルの詳細な検討はこれまでにほとんど報告されていない。最近、様々なグループによって UBIAD1 遺伝子の発現制御機構や UBIAD1 タンパク質の機能解析などが報告されている。

Funahashi らは UBIAD1 遺伝子の発現制御機構を明らかにする目的で、UBIAD1 プロモーター解析を行った。初めに、5'-RACE 法を用いて UBIAD1 の翻訳開始点から 306 bp 上流に転写開始点が存在し、UBIAD1 プロモーターが典型的な TATA box が存在しない TATA less プロモーターであることを見出した。次に、UBIAD1 プロモーターの 5' 側から deletion を行ったフラグメントをルシフェラーゼレポーター遺伝子と融合したコンストラクトを作製し、UBIAD1 プロモーターに存在する転写制御領域を決定した。さらに *in silico* 解析により、転写開始点付近に高度に種間で保存されている領域が存在し、この領域に転写因

子 Yin Yang 1 (YY1) の結合配列 (CAANATGGC) が存在することが分かった⁵²⁾。YY1 はあらゆる組織にユビキタスに発現する zinc-finger 型転写因子で、GLO Kruppel-related family に属する^{53, 54)}。特に YY1 は、ガン遺伝子やガン抑制遺伝子の発現を調整する事によって細胞増殖を制御することがこれまでに報告されている⁵⁵⁻⁵⁹⁾。そこで、YY1 の結合配列を変異させ解析を行った結果、予想された YY1 結合配列が UBIAD1 プロモーター活性化に重要であることが示唆された。また、Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) および Chromatin immunoprecipitation (ChIP) アッセイを用いて、YY1 が YY1 結合配列に直接結合することを明らかにした。さらに、RNAi 法を用いた YY1 遺伝子ノックダウンにより内在性の UBIAD1 の発現量が減少し、MK-4 変換活性が低下した。このような検討から、Funahashi らは UBIAD1 遺伝子の転写制御の分子メカニズムを明らかにし、UBIAD1 遺伝子のレギュレーターとして YY1 を同定した (図 7)⁵²⁾。

Hirota らは、UBIAD1 タンパク質の機能解析を行

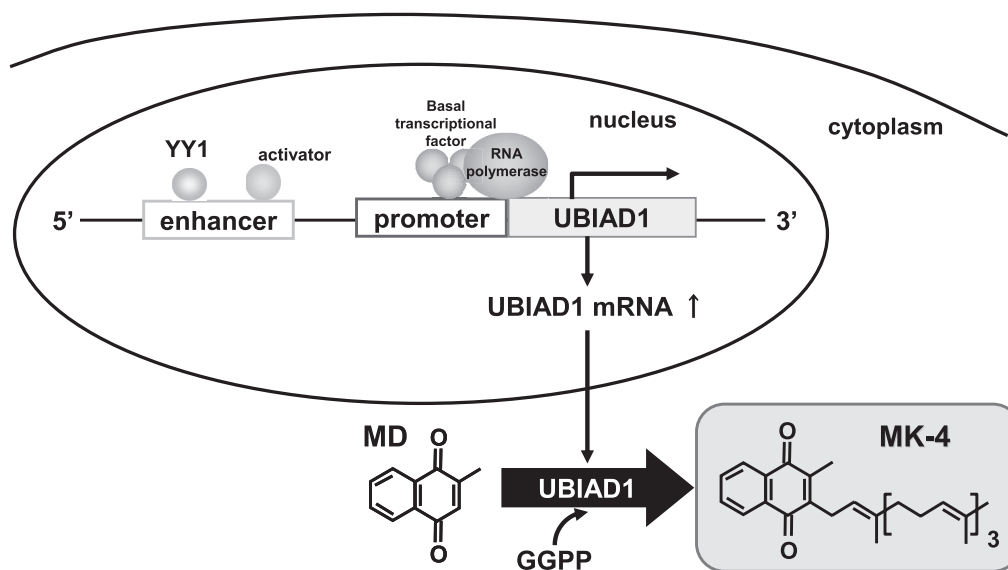


図7 UBIAD1 遺伝子発現を促進する転写活性化因子 YY1

う目的で、UBIAD1 の酵素化学的性質を検討した³³⁾。初めに、ヒト UBIAD1 の結晶構造を明らかにするため、UBIAD1 の結晶化を試みたが、ヒト UBIAD1 は膜貫通回数が多く、結晶化は成功しなかった。また、Cheng や Huang らは古細菌を用いて ubiA の結晶構造を明らかにしたが^{45, 60)}、ヒト UBIAD1 は系統樹から ubiA ファミリーでなく、menA ファミリーに属しているため UBIAD1 タンパク質の詳細は明らかでない。そこで、UBIAD1 の酵素化学的な性質を調べるため、UBIAD1 と高い相同性を有するプレニル化酵素との相同性解析を行い、高度に保存された領域およびアミノ酸を見い出すと共に、その変異体の MK-4 変換活性を評価した。小胞体成分を多く含む UBIAD1 を発現した Sf9 細胞のミクロソーム画分を用いて、UBIAD1 タンパク質の酵素化学的な性質について検討した。UBIAD1 の酵素反応条件に関して、pH8.5～9.0 の塩基性条件下、0.1 mM 以上の DTT 存在下において MK-4 変換活性が最も高いことが明らかとなった。また、GGPP よりも側鎖長の短い geranyl pyrophosphate (GPP) や farnesyl pyrophosphate (FPP) も側鎖源として UBIAD1 に認識され、プレニル化の基質となることもわかった。さらに、メバロン酸代謝経路阻害剤である脂溶性 Statin が UBIAD1 の酵素活性を直接阻害することを見出した (図8)³³⁾。

次に UBIAD1 タンパク質の構造的特徴を明らかにするため、ヒト UBIAD1 と各種哺乳動物および生物種の UBIAD1 アミノ酸配列との相同性解析を行い、4 つの高度に保存されている領域 (保存領域 I～IV) に着目した。そこで、4 つの保存領域やアミノ酸を欠損させた変異体を作製し酵素活性を評価した。UBIAD1 保存領域を欠損させた変異体では酵素活性は全く検出されなかったことから、これら 4 つの保存領域は活性発現に極めて重要であると考えられた。さらに、これらの領域内において高度に保存されているアミノ酸についてアラニン変異体および SCD 変異体を作製し、酵素活性を測定した。その結果、保存領域 I は 2 次構造上 2 番目と 3 番目の小胞体膜貫通部位をつなぐ小胞体膜外ループ領域に位置し、基質が結合することによって構造変化を伴う基質の認識部位であると考えられる。このうち特に、112 番目のアスパラギン酸は FPP から MK-3 を変換する際に重要な基質認識部位と予想される。保存領域 II は、2 次構造上 3 番目の小胞体膜貫通部位に位置し、CxxC motif が存在する酸化還元ドメインであると考えられる。保存領域 III は、2 次構造上 4 番目と 5 番目の小胞体膜貫通部位をつなぐ小胞体膜外ループ領域に位置し、2 次構造上ヒンジ領域と考えられ UBIAD1 酵素の触媒部位が存在する重要な領域と考えられる。保存領域 IV は、

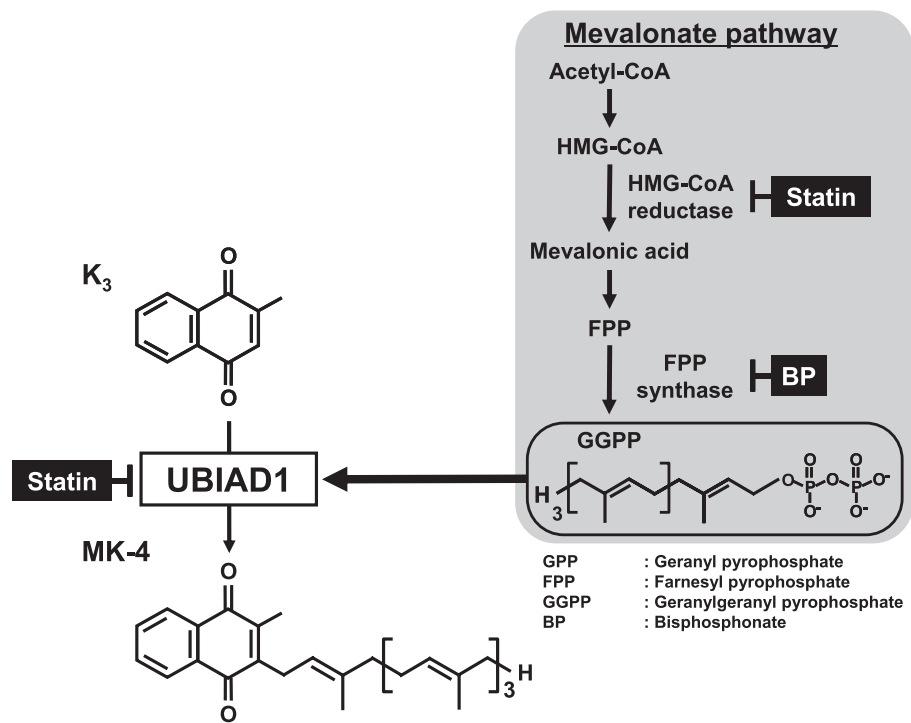


図8 MK-4変換に対するメバロン酸代謝経路阻害剤の関与

2次構造上6番目と7番目の小胞体膜貫通部位をつなぐ小胞体膜外ループ領域に位置し、Mg²⁺/イソプレニル側鎖の結合部位であると推察される。このよう

に、UBIAD1変異体を用いた検討からUBIAD1の酵素化学的性質の一端を理解する事に成功した³³⁾(図9)。

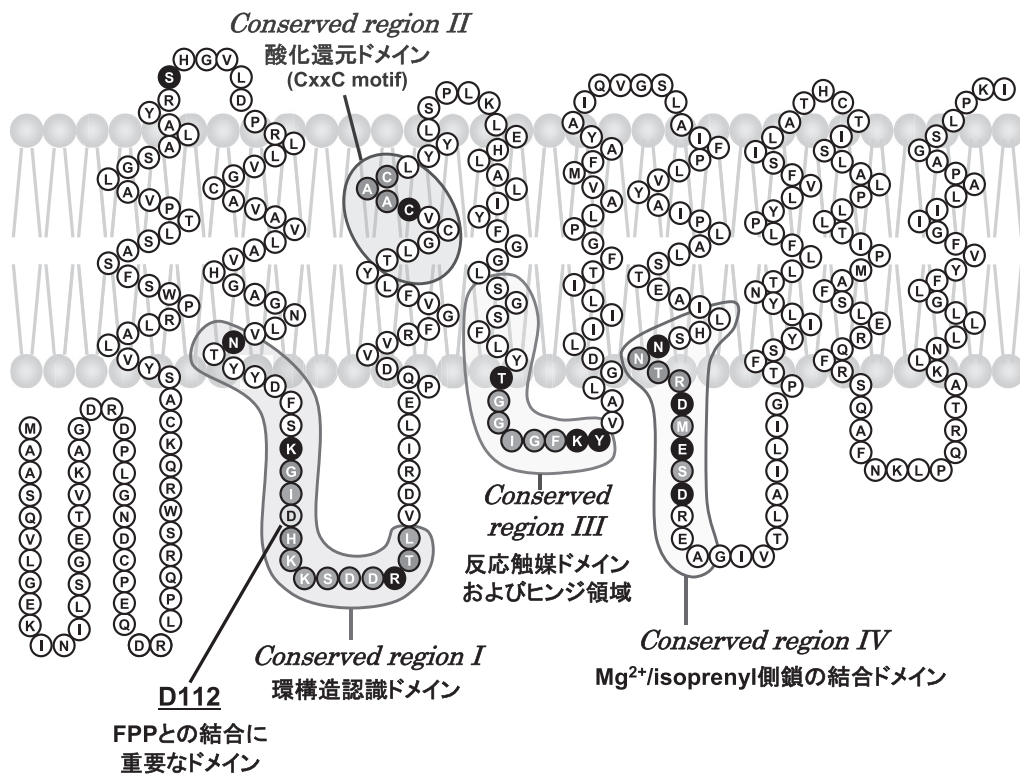


図9 UBIAD1タンパク質の予想される2次構造および各アミノ酸の役割 (文献33 改変)

7. おわりに

栄養素として食事から摂取されたビタミン K は、UBIAD1 によって生体内で MK-4 に変換され、様々な生物種において細胞や組織で重要な役割を担っている（図 10）。UBIAD1 によって変換された MK-4 は活性型ビタミン K として、GGCX や SXR, PKA 経路等を介して血液凝固や骨形成など生理作用を発揮している。このようなことから、MK-4 はもはやビタミンの枠を超えて、生理的にも栄養学的にも重要なホルモン様の作用を有していると考えられる。今後、組織特異的な *Ubiad1* 遺伝子欠損マウスを解析することで、各組織における UBIAD1 および変換された MK-4 の生理的役割の全貌を明らかに出来ると考えられる。また、ヒト UBIAD1 の結晶構造が明らかになれば、SCD をはじめとする UBIAD1 が関連する様々な疾患の発症機構が解明され、UBIAD1 をターゲットにした創薬研究につながると考えられる。今後 UBIAD1 や MK-4 が生体にとってどのような重要な

役割を担っているかを明らかにすることで、ビタミン K 研究のさらなる発展や臨床応用につながると期待される。

参考文献

- 1) Dam H, Schönheyder F, Tage-Hansen E : Studies on the mode of action of vitamin K. *Biochem J*, **30**, 1075-1079, 1936.
- 2) Thayer SA, Maccorquodale DW, Binkley SB, Doisy EA : The Isolation of a Crystalline Compound with Vitamin K Activity. *Science*, **88**, 243, 1938.
- 3) Shearer MJ : Vitamin K. *Lancet*, **345**, 229-234, 1995.
- 4) Suttie JW : The importance of menaquinones in human nutrition. *Annu Rev Nutr*, **15**, 399-417, 1995.
- 5) Thijssen HH, Vervoort LM, Schurgers LJ et al. : Menadiol is a metabolite of oral vitamin K. *Br. J Nutr*, **95**, 260-266, 2006.
- 6) Stafford DW : The vitamin K cycle. *J Thromb Hae-*

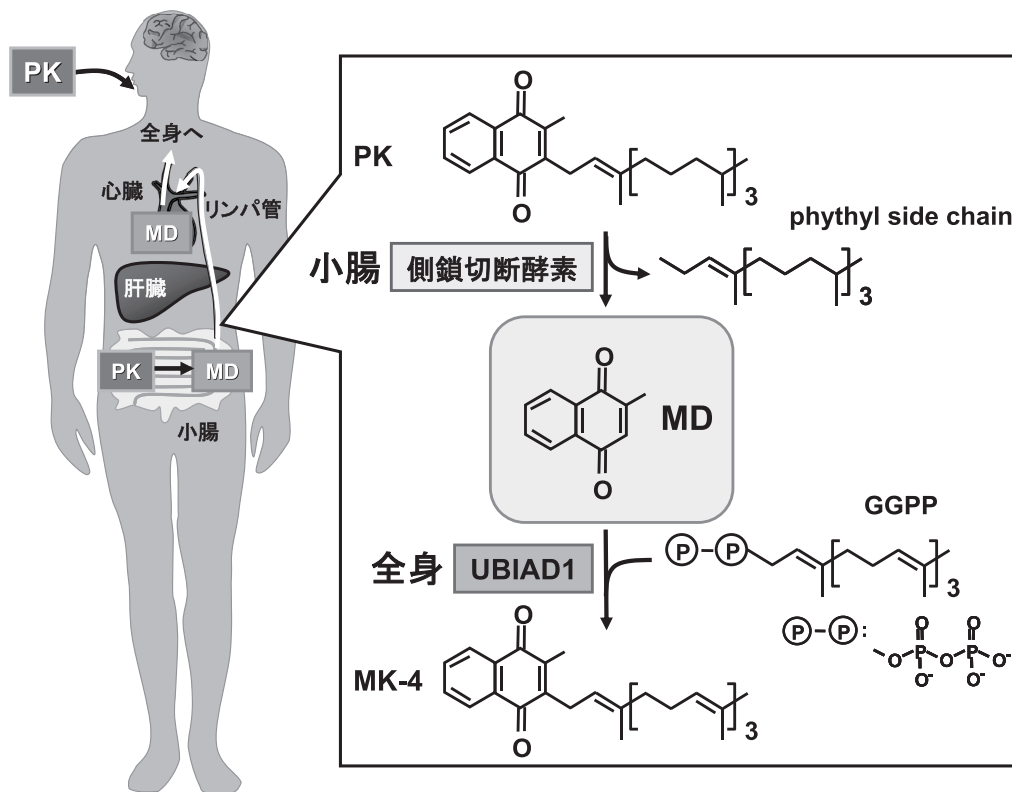


図 10 生体内における PK から MK-4 への変換機構

- mostasis, **3**, 1873-1878, 2005.
- 7) Tabb MM, Sun A, Zhou C et al. : Vitamin K₂ regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. *J Biol Chem*, **278**, 43919-43927, 2003.
- 8) Jones SA, Moore LB, Shenk JL et al. : The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Mol Endocrinol*, **14**, 27-39, 2000.
- 9) Moore LB, Parks DJ, Jones SA et al. : Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J Biol Chem*, **275**, 15122-15127, 2000.
- 10) Suhara Y, Motoyoshi S, Hirota Y et al. : Structure-activity relationship of novel vitamin K analogues as steroid and xenobiotic receptor (SXR) agonists. *Yakugaku Zasshi*, **132**, 881-886, 2012.
- 11) Synold TW, Dussault I, Forman BM : The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med*, **7**, 584-590, 2001.
- 12) Xie W, Barwick JL, Downes M et al. : Humanized xenobiotic response in mice expressing nuclear receptor SXR. *Nature*, **406**, 435-439, 2000.
- 13) Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K et al. : Steroid and xenobiotic receptor SXR mediates vitamin K₂-activated transcription of extracellular matrix-related genes and collagen accumulation in osteoblastic cells. *J Biol Chem*, **281**, 16927-16934, 2006.
- 14) Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K et al. : Vitamin K₂ induces phosphorylation of protein kinase A and expression of novel target genes in osteoblastic cells. *J Mol Endocrinol*, **39**, 239-247, 2007.
- 15) Suhara Y, Murakami A, Nakagawa K et al. : Comparative uptake, metabolism, and utilization of menaquinone-4 and phyloquinone in human cultured cell lines. *Bioorg Med Chem*, **14**, 6601-6607, 2006.
- 16) Buitenhuis HC, Soute BA, Vermeer C : Comparison of the vitamins K₁, K₂ and K₃ as cofactors for the hepatic vitamin K-dependent carboxylase. *Biochem. Biophys Acta*, **1034**, 170-175, 1990.
- 17) Otsuka M, Kato N, Shao RX et al. : Vitamin K₂ inhibits the growth and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells via protein kinase A activation. *Hepatology*, **40**, 243-251, 2004.
- 18) Hitomi M, Yokoyama F, Kita Y et al. : Antitumor effects of vitamins K₁, K₂ and K₃ on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Int J Oncol*, **26**, 713-720, 2005.
- 19) Tsujioka T, Miura Y, Otsuki T et al. : The mechanisms of vitamin K₂-induced apoptosis of myeloma cells. *Haematologica*, **91**, 613-619, 2006.
- 20) Josey BJ, Inks ES, Wen X et al. : Structure-activity relationship study of vitamin K derivatives yields highly potent neuroprotective agents. *J Med Chem*, **14**, 1007-1022, 2013.
- 21) Vos M, Esposito G, Edirisinghe JN et al. : Vitamin K₂ is a mitochondrial electron carrier that rescues pink1 deficiency. *Science*, **336**, 1306-1310, 2012.
- 22) Okano T, Shimomura Y, Yamane M et al. : Conversion of phyloquinone (Vitamin K₁) into menaquinone-4 (Vitamin K₂) in mice: two possible routes for menaquinone-4 accumulation in cerebra of mice. *J Biol Chem*, **283**, 11270-11279, 2008.
- 23) Thijssen HH, Drittij-Reijnders MJ : Vitamin K status in human tissues: tissue-specific accumulation of phyloquinone and menaquinone-4. *Br J Nutr*, **75**, 121-127, 1996.
- 24) Thijssen HH, Drittij-Reijnders MJ : Vitamin K distribution in rat tissues: dietary phyloquinone is a source of tissue menaquinone-4. *Br J Nutr*, **72**, 415-425, 1994.
- 25) Martius C, Esser HO : The constitution of vitamin K formed from methyl-naphthoquinone in animal body. *Biochem Z*, **331**, 1-9, 1958.
- 26) Ronden JE, Drittij-Reijnders MJ, Vermeer C et al. : Intestinal flora is not an intermediate in the phylo-

- quinone-menaquinone-4 conversion in the rat. *Biochim Biophys Acta*, **1379**, 69-75, 1998.
- 27) Davidson RT, Foley AL, Engelke JA et al. : Conversion of dietary phyloquinone to tissue menaquinone-4 in rats is not dependent on gut bacteria. *J Nutr*, **128**, 220-223, 1998.
 - 28) Kimura S, Satoh H, Komai M : The roles of intestinal flora and intestinal function on vitamin K metabolism. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 425-428, 1992.
 - 29) Nakagawa K, Hirota Y, Sawada N et al. : Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature*, **468**, 117-121, 2010.
 - 30) Hirota Y, Tsugawa N, Nakagawa K et al. : Menadiolone (vitamin K₃) is a catabolic product of oral phyloquinone (vitamin K₁) in the intestine and a circulating precursor of tissue menaquinone-4 (vitamin K₂) in rats. *J Biol Chem*, **288**, 33071-33080, 2013.
 - 31) Holstein SA, Wohlford-Lenane CL, Hohl RJ : Isoprenoids influence expression of Ras and Ras-related proteins. *Biochemistry*, **41**, 13698-13704, 2002.
 - 32) Sorrentino G, Ruggeri N, Specchia V et al. : Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway. *Nat Cell Biol*, **16**, 357-366, 2014.
 - 33) Hirota Y, Nakagawa K, Sawada N et al. : Functional Characterization of the Vitamin K₂ Biosynthetic Enzyme UBIAD1. *PLoS One*, **10**, e0125737, 2015.
 - 34) Shineberg B, Young IG : Biosynthesis of bacterial menaquinones: the membrane-associated 1,4-dihydroxy-2-naphthoate octaprenyltransferase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **15**, 2754-2758, 1976.
 - 35) Saito Y, Ogura K : Biosynthesis of menaquinones. Enzymatic prenylation of 1,4-dihydroxy-2-naphthoate by *Micrococcus luteus* membrane fractions. *J Biochem*, **89**, 1445-1452, 1981.
 - 36) Truglio JJ, Theis K, Feng Y et al. : Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* MenB, a key enzyme in vitamin K₂ biosynthesis. *J Biol Chem*, **89**, 42352-42360, 2003.
 - 37) Fredericks WJ, McGarvey T, Wang H et al. : The bladder tumor suppressor protein TERE1 (UBIAD1) modulates cell cholesterol: implications for tumor progression. *DNA Cell Biol*, **30**, 851-864, 2011.
 - 38) McGarvey TW, Nguyen TB, Malkowicz SB : An interaction between apolipoprotein E and TERE1 with a possible association with bladder tumor formation. *J Cell Biochem*, **95**, 419-428, 2005.
 - 39) McGarvey TW, Nguyen T, Puthiyaveetil R et al. : TERE1, a novel gene affecting growth regulation in prostate carcinoma. *Prostate*, **54**, 144-155, 2003.
 - 40) Orr A, Dubé MP, Marcadier J et al. : Mutations in the UBIAD1 gene, encoding a potential prenyltransferase, are causal for Schnyder crystalline corneal dystrophy. *PLoS One*, **2**, e685, 2007.
 - 41) Nickerson ML, Kostihina BN, Brandt W et al. : UBIAD1 mutation alters a mitochondrial prenyltransferase to cause Schnyder corneal dystrophy. *PLoS One*, **5**, e10760, 2010.
 - 42) Nickerson ML, Bosley AD, Weiss JS et al. : The UBIAD1 prenyltransferase links menaquinone-4 synthesis to cholesterol metabolic enzymes. *Hum Mutat*, **34**, 317-29, 2013.
 - 43) Yazaki K, Kunihiisa M, Fujisaki T et al. : Geranyl diphosphate:4-hydroxybenzoate geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon*. Cloning and characterization of a ket enzyme in shikonin biosynthesis. *J Biol Chem*, **277**, 6240-6246, 2002.
 - 44) Forsgren M, Attersand A, Lake S et al. : Isolation and functional expression of human COQ2, a gene encoding a polyprenyl transferase involved in the synthesis of CoQ. *Biochem J*, **382**, 519-526, 2004.
 - 45) Quinzii C, Naini A, Salvati L et al. : A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet*, **78**, 345-349, 2006.
 - 46) Huang H, Levin EJ, Liu S et al. : Structure of a membrane-embedded prenyltransferase homologous

- to UBIAD1. PLoS Biol, **12**, e1001911, 2014.
- 47) Mugoni V, Postel R, Catanzaro V et al. : Ubiad1 is an antioxidant enzyme that regulates eNOS activity by CoQ10 synthesis. Cell, **152**, 504-518, 2013.
- 48) Wang X, Wang D, Jing P et al. : A novel Golgi retention signal RPWS for tumour suppressor UBIAD1. PLoS One, **8**, e72015, 2013.
- 49) L Hong, Z Ying, J Pan et al. : LAY, a new endoplasmic reticulum retention signal for UBIAD1 protein. IJRSB, **3**, 20-32, 2015.
- 50) Nakagawa K, Sawada N, Hirota Y et al. : Vitamin K₂ biosynthetic enzyme, UBIAD1 is essential for embryonic development of mice. PLoS One **9**, e104078, 2014.
- 51) Hegarty JM, Yang H, Chi NC : UBIAD1-mediated vitamin K₂ synthesis is required for vascular endothelial cell survival and development. Development, **140**, 1713-1719, 2013.
- 52) Funahashi N, Hirota Y, Nakagawa K et al. : YY1 positively regulates human UBIAD1 expression. Biochem Biophys Res Commun, **460**, 238-244, 2015.
- 53) Park K, Atchison ML : Isolation of a candidate repressor/activator, NF-E1 (YY-1, delta), that binds to the immunoglobulin kappa 3' enhancer and the immunoglobulin heavy-chain mu E1 site. Proc Natl Acad Sci USA, **88**, 9804-9808, 1991.
- 54) Shi Y, Seto E, Chang LS et al. : Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. Cell, **67**, 377-388, 1991.
- 55) Riggs KJ, Saleque S, Wong KK et al. : Yin-yang 1 activates the c-myc promoter. Mol Cell Biol, **13**, 7487-7495, 1993.
- 56) Natesan S, Gilman MZ : DNA-bending and orientation-dependent function of YY1 in the c-fos promoter. Genes Dev, **7**, 2497-2509, 1993.
- 57) Yakovleva T, Kolesnikova L, Vukojević V et al. : YY1 binding to a subset of p53 DNA-target sites regulates p53-dependent transcription, Biochem Biophys Res Commun, **318**, 615-624, 2004.
- 58) Wang X, Feng Y, Xu L et al. : YY1 restrained cell senescence through repressing the transcription of p16. Biochim Biophys Acta, **1783**, 1876-1883, 2008.
- 59) Austen M, Cerni C, Lüscher-Firzlaff JM et al. : YY1 can inhibit c-Myc function through a mechanism requiring DNA binding of YY1 but neither its transactivation domain nor direct interaction with c-Myc. Oncogene, **17**, 511-520, 1998.
- 60) Cheng W, Li W : Structural insights into ubiquinone biosynthesis in membranes. Science, **343**, 878-881, 2014.

Physiological role of vitamin K₂ converting enzyme UBIAD1.

Yoshihisa HIROTA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Suzuka University of Medical Science

Key Words: Vitamin K; UBIAD1; phyloquinone, menaquinone, menadione, gene deficient mouse

Abstract

The three molecular forms of vitamin K can be distinguished by the differences in the alkyl side chains at the 3-position of the common 2-methyl-1,4-naphthoquinone group. Plant-derived vitamin K₁ (phyloquinone : PK) carries a phytol group and bacteria-derived vitamin K₂ (menaquinone-n : MK-n) carries a polyisoprenyl side chain; vitamin K₃ (menadione : MD) is a synthetic compound that lacks a side chain. PK is a major form of dietary vitamin K; however, the most prevalent form of vitamin K in animals and humans is menaquinone-4 (MK-4). It is postulated that PK is converted into MK-4 and accumulates in several tissue types; however, the molecular mechanisms for these conversion reactions have been unclear for more than 50 years. Recently, the metabolic mechanism of vitamin K has been elucidated. MK-4 is produced by the cleavage of the phytol side chain from dietary PK, which releases MD in the intestine, followed by the delivery of MD through the mesenteric lymphatic system to the tissues, where it is then converted to MK-4 by UbiA prenyltransferase domain containing protein 1 (UBIAD1). With the discovery of UBIAD1, recently, the association between UBIAD1 and the disease has been revealed by various studies focusing on UBIAD1. This paper describes the function of the vitamin K conversion mechanism and the conversion enzyme UBIAD1 by examining recently published research.

略 歴

廣田 佳久（博士 [薬学]） 鈴鹿医療科学大学 薬学部 薬学科 助手

学 歴：

平成 18 年 神戸薬科大学 薬学部 薬学科 卒業
 平成 20 年 神戸薬科大学大学院 薬学研究科 医療薬科学専攻 修士課程 修了
 平成 25 年 神戸薬科大学大学院 薬学研究科 薬学専攻 博士課程 修了

職 歴：

平成 20 年 協和発酵工業株式会社 生産技術研究所 研究員
 平成 24 年 独立行政法人 日本学術振興会 特別研究員 DC
 平成 25 年 神戸薬科大学大学院 博士研究員
 平成 25 年 独立行政法人 日本学術振興会 特別研究員 PD
 平成 26 年 鈴鹿医療科学大学 薬学部 薬学科 助手

受賞歴：

平成 23 年 日本ビタミン学会 学生優秀発表賞
 平成 26 年 ネスレ栄養科学会議（NNCJ）論文賞
 平成 27 年 コスモ・バイオ学術論文賞

学会活動：

日本ビタミン学会（正会員）
 日本生化学会（正会員）
 日本薬学会（正会員）

主な研究内容：

生体内におけるビタミン K 合成機構の解明
 加齢性疾患（骨粗鬆症や脳血管疾患等）に対するビタミン K の役割に関する研究